



TITLE:

イソキノリンアルカロイド生合成系に関わる新規シトクロムP450遺伝子の探索と合成生物学(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

堀, 健太郎

CITATION:

堀, 健太郎. イソキノリンアルカロイド生合成系に関わる新規シトクロムP450遺伝子の探索と合成生物学. 京都大学, 2017, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2017-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20591>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-05-22に公開; 許諾条件により要旨は2017-08-22に公開

京都大学	博士（生命科学）	氏名	堀健太郎
論文題目	イソキノリンアルカロイド生合成系に関わる新規シトクロム P450 遺伝子の探索と合成生物学		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>高等植物が産生するアルカロイドには強力な生理活性を示すものが多く、医薬品等として広く利用されている。特に、イソキノリンアルカロイド（IQA）には多くの有用医薬品が含まれ、その生合成系の分子レベルでの解明が進んでいる。また、蓄積した生合成遺伝子に関する知見を基盤とし、近年、合成生物学を利用した微生物発酵による物質生産研究が進められている。本研究では、効率的な IQA 生産系の開発を目的として、小胞局在酵素およびシトクロム P450 高発現系を微生物において構築するとともに、ハナビシソウドラフトゲノム情報を利用した未解明の IQA、特に macarpine 生合成酵素遺伝子の探索と同定を行った。</p> <p>第一章では、異種発現宿主としてメタノール資化性酵母 <i>Pichia pastoris</i> に着目し、小胞局在酵素（Berberine bridge enzyme:BBE）と P450（CYP719A5、CYP719A2）が関与する stylophine 生合成系の再構築を行った。その結果、単一の菌体で生合成酵素遺伝子を多重発現させることで、2～4 時間で reticuline から stylophine を高効率で生産することができ、同反応系が迅速なアルカロイド変換に極めて有効であることを示した。また、生合成酵素を単独で発現させた菌体を共培養した場合でも、48～72 時間を要したものの、最終的に単一菌体における多重発現と同程度の変換効率を達成できることを明らかとした。共培養系では、細胞間の物質輸送が律速となる一方、単一菌体における多重発現で認められた反応副産物による酵素阻害を回避することで、連続的な変換反応が維持されることが示唆された。また、本システムは、ピキア酵母ゲノムへの挿入系を利用しているため、多様な生合成経路の改変および再構築を容易に行う上で有用なツールボックスが開発できたと考えられた。</p> <p>第二章では、ハナビシソウのドラフトゲノム情報をもとに、IQA 生合成に関わる新規 P450 遺伝子、特に未同定であった macarpine 生合成酵素遺伝子の単離と同定を行った。まず、ハナビシソウゲノムにおいて IQA 生合成酵素遺伝子のクラスター形成が認められず、ケシに特有の IQA である morphine 生合成系や noscapine 生合成系に特徴的な P450 ホモログは検出されなかった。一方、これまでに IQA 生合成系に存在する P450 ファミリー（CYP80, CYP82, CYP719）がハナビシソウに多数存在することをシロイヌナズナとの比較において明らかにした。特に CYP82 ファミリーには多くの遺伝子が存在するとともに、同一 scaffold 上でクラスターを形成していた。分子系統樹解析により、遺伝子クラスターの形成は遺伝子重複の結果であり、機能が多様化していったものと推測された。一方、これらの重複した遺伝子は異なる組織や培養細胞に特徴的な発現プロファイルを示した。なお、P450 配列の多くでエキソン/イントロン構造に保存性が認められた。さらに全長配列を単離し酵素活性を解析した結果、CYP82-3（CYP82P2）と CYP82-1 like（CYP82P3）にベンゾフェナンスリジンアルカロイドの 10 位水酸化活性を認めた。すなわち、CYP82P2 は dihydrosanguinarine を特異的に、一方、CYP82P3 は dihydrosanguinarine と dihydrochelerythrine を水酸化することを明らかとした。CYP82P2 と CYP82P3 の発現はアルカロイドプロファイルの違いに対応しており、IQA 生合成の制御に関与している可能性が考えられた。</p> <p>以上のように、本研究で得られた知見から、より多様で効率的なアルカロイドの微生物生産が可能になるとともに、ドラフトゲノム情報を用いた新規生合成酵素遺伝子の探索、さらには生合成系の分子進化に関する研究の進展が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

高等植物が産生するイソキノリンアルカロイド (IQA) には多くの有用医薬品が含まれ、その生合成系の分子レベルでの解明が進んでいる。また、生合成遺伝子情報を基盤とし、合成生物学を利用した微生物発酵による物質生産の開発研究が近年進められている。本研究では、効率的な IQA 生産系の開発を目的として、小胞局在酵素およびシトクロム P450 高発現系を微生物において構築するとともに、ハナビシソウのドラフトゲノム情報を利用した未解明の IQA、特に macarpine 生合成酵素遺伝子の探索と同定が行われ、以下のような成果が得られている。

1) メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* において、小胞局在酵素 (BBE) と P450 (CYP719A5、CYP719A2) による stylopine 生合成系を再構築し、単一の菌体に生合成酵素遺伝子を多重発現させることで、わずか 2~4 時間で reticuline から stylopine を高効率で生産することができることを示した。

2) 生合成酵素を単独で発現させた菌体の共培養により、より長時間 (48~72 時間) を要するが、最終的に単一菌体における多重発現と同程度の変換効率を達成できることを明らかにした。

3) 共培養系では、細胞間の物質輸送が律速となる一方、単一菌体における多重発現で認められた反応副産物による酵素活性阻害を回避できるため、連続的な変換反応が維持されることを明らかにした。

4) ハナビシソウのドラフトゲノム情報をもとに、IQA 生合成に関わる新規 P450 遺伝子、特に未同定であった macarpine 生合成酵素遺伝子の単離と同定を行い、まず、ハナビシソウゲノムにおいて IQA 生合成酵素遺伝子のクラスター形成がみられないこと、ケシに特有の IQA である morphine 生合成系や noscapine 生合成系の P450 ホモログが検出されないことを示した。

5) IQA 生合成系に存在する P450 ファミリー (CYP80, CYP82, CYP719) がハナビシソウに多数存在することをシロイヌナズナとの比較において明らかにするとともに、特に CYP82 ファミリーの多くの遺伝子が同一 scaffold 上でクラスターを形成していることを明らかにした。また、これらの重複した遺伝子が異なる組織や培養細胞に特徴的な発現プロファイルを示すことを明らかにした。

6) さらに酵素活性を解析し、CYP82-3(CYP82P2)は dihydrosanguinarine を特異的に、一方、CYP82-1L(CYP82P3)は dihydrosanguinarine と dihydrochelerythrine の 10 位を水酸化することを明らかにするとともに、CYP82P2 と CYP82P3 の発現はアルカロイドプロファイルの違いに対応しており、IQA 生合成の制御に関与している可能性を示唆した。

以上、本論文は、より多様で効率的な植物アルカロイドの微生物生産系の開発、ならびに植物二次代謝産物生合成系の分子進化に関する新たな知見を提示した意義深いものである。また、植物生命科学に関する高度で幅広い学識、植物天然物化学分野における優れた研究能力、そして植物生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念等が論理的かつ一貫性をもって記述されていることから、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成 29 年 3 月 8 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 2017 年 8 月 22 日